

「生物の発生・分化・再生」

平成 14 年度採択研究代表者

中山 敬一

(九州大学生体防御医学研究所 教授)

「細胞周期の再活性化による再生能力の賦活化の研究」

1. 研究実施の概要

成人において細胞周期に入っている細胞は 1%以下の少数の細胞であり、その他大部分の細胞は細胞周期から逸脱して休止状態にある。幹細胞は細胞周期に再進入する能力を有するが、最終分化を遂げた神経・心筋細胞は、傷害があってもほとんど再生せず、その組織の欠損は生命の危機に直結する。なぜ分化と共に細胞周期への再進入能力が失われるかという謎に対しては、全くわかっていないのが現状である。逆に細胞周期が静止期への脱出機能が喪失し、無限の増殖を続けるようになることが癌であると理解されているが、その分子機構についても全く明らかではない。すなわち日本人における三大死因を構成する癌、虚血性心疾患、脳虚血性疾患には全て細胞周期からの脱出・再進入が関与していると言っても過言ではない。

われわれは、細胞周期から静止期(G0期)への脱出と、G0期から細胞周期への再進入の制御過程に関する分子メカニズムを明らかにすることによって、細胞分化と増殖とのコントロール機構を解明することを目指している。細胞周期への再進入は、細胞周期ブレーキ p27 の分解因子として Skp2 および KPC を同定し、その機能について分子的詳細をほぼ明らかにすることができた。さらに細胞周期からの脱出についても Fbw7 が細胞周期アクセルである c-Myc を制御していることを最近突き止めた。そこで、Skp2 や Fbw7 の遺伝子変異がマウスの種々の組織の発生や分化に対してどのような影響を及ぼすか、また組織再生においてどのような役割を果たすかを解析した。その結果、細胞周期と組織分化の関係が遺伝学的に明らかになってきた。この二つのユビキチンリガーゼによる細胞周期の制御機構は、個体の大きさや細胞の増殖速度を決定する重要な因子であるだけでなく、発がん過程に深く関与する分子であることが明らかとなってきた。

2. 研究実施内容

細胞増殖と分化は密接に関係していることが推測されているが、その分子メカニズムはほとんど不明である。がんにおいて多くの場合に増殖が盛んながんほど未分化である傾向があり(脱分化)、分化における増殖停止機構の破綻が発がんにつながると考えられているが、その実証はない。われわれは哺乳類で最も細胞分化の研究が進んでいる T 細胞を用いてこの問題にアプローチしている。T 細胞は胸腺内において DN(CD4-8-)→DP(CD4+8+)→SP(CD4+8-または CD4-8+)という

分化段階を経て成熟していくが、細胞が激しく増殖するのは DN 後期に限られ、DP 以降は細胞周期が停止する。この DP における増殖停止メカニズムは永らく不明であった。われわれはユビキチンリガーゼ Fbw7 の T 細胞系列におけるコンディショナルノックアウトマウスを作製したところ、胸腺が腫大しており、DP が特異的に増加していることを見出した。DP では本来細胞周期が停止するべきところ、Fbw7 が欠損していると細胞周期が停止せず、Fbw7 が DP における細胞周期停止に必須であることが判明した。さらに、このマウスでは胸腺原発の T 細胞リンパ腫を発症、死亡することがわかった。

次にわれわれは、この DP 期における細胞周期停止異常のメカニズムを調べた。ウェスタンブロッティング法により、Fbw7 コンディショナルノックアウトマウスの DP では c-Myc と Notch の異常発現が観察された。そこで Fbw7 コンディショナルノックアウトマウスと RBP-J コンディショナルノックアウトマウスまたは c-Myc コンディショナルノックアウトマウスを交配させて、それぞれダブルコンディショナルノックアウトマウス ($Fbw7^{flox/flox}; RBP-J^{flox/flox}$; CD4-Cre または $Fbw7^{flox/flox}; c-Myc^{flox/flox}$; CD4-Cre) を作製した。RBP-J は Notch の転写活性化に必要な協同分子であり、その欠損は 4 つの Notch ファミリーメンバー全ての機能を不活化する。この実験の結果、Notch の欠失によっても Fbw7 欠損における増殖過剰の表現型は認められることから、これらの異常は Fbw7 による Notch の分解異常とは関係ないと結論された。一方で c-Myc の分解過程に異常を来した結果であると考えられた。つまり未熟 T 細胞では、Fbw7 の欠損は c-Myc の蓄積を来し、増殖促進と腫瘍発生につながることを示された。

しかしながら、Fbw7 が欠損した状態でも、成熟 T 細胞になると細胞周期が停止するようになる。この原因を調べるために、Fbw7 コンディショナルノックアウトマウスの T 細胞を抗原刺激し、細胞周期を回転させてみたが、細胞周期の進行は G1-S 期においてブロックされていた。同時に c-Myc の増加とそれに反応して p53 の誘導が確認された。p53 の誘導は細胞周期を G1-S 期で停止させ、アポトーシスを増加されることが予想され、Fbw7 欠損 T 細胞の表現型と一致する。そこでこの仮説を検証するため、Fbw7 コンディショナルノックアウトマウスと p53 ノックアウトマウスを交配して、ダブルノックアウトマウスを作製した ($Fbw7^{flox/flox}; p53^{-/-}$; Lck-Cre)。すると G1-S 期における細胞周期停止が解除され、アポトーシスが減少した。このことは、成熟 T 細胞における、未熟細胞と正反対の表現型は、p53 の活性化に因っていることを示している。つまり成熟 T 細胞においては、c-Myc の異常発現が p53 を誘導し、その結果細胞周期停止とアポトーシスの上昇を招くことが明らかとなった。このことから、Fbw7 の欠失は c-Myc の過剰発現を招き、短期的に細胞周期を回転させるものの、p53 によるチェックポイントが作用して細胞周期は強制的に停止させられることが示唆される。しかしこのような不安定な状態は、長期間のうちに p53 遺伝子に変異が入ることによって容易に癌化することが判明した。最近ヒトのリンパ腫において Fbw7 の異常が多く報告されており、本研究結果はそのメカニズムを具体的に再現したものである。

3. 研究実施体制

(1)「九州大学・中山 敬一」グループ

①研究者名

中山 敬一(九州大学 教授)

②研究項目

- ・ G0→G1 移行期における p27 の分解メカニズムの研究、Fbw7 による c-Myc の分解メカニズムの研究、細胞分化における細胞増殖のコントロールの研究

(2)「東北大学・中山 啓子」グループ

①研究者名

中山 啓子(東北大学 教授)

②研究項目

- ・ Skp2 の主要な標的の探索、F-box タンパク質の系統的ノックアウトマウスの作製と解析

4. 研究成果の発表等

(1)原著論文発表(原著論文)

- Humphries, M.J., Limesand, K.H., Schneider, J.C., Nakayama, K.I., Anderson, S.M., Reyland, M.E.: Suppression of apoptosis in the protein kinase C δ null mouse in vivo. *J. Biol. Chem.*, 281: 9728-9737 (2006).
- Kase, S., Yoshida, K., Ohgami, K., Shiratori, K., Ohno, S., Nakayama, K.I.: Phosphorylation of p27^{Kip1} in the mitotic cells of the corneal epithelium. *Curr. Eye Res.*, 31: 307-312 (2006).
- Parcellier, A., Brunet, M., Schmitt, E., Col, E., Didelot, C., Hammann, A., Nakayama, K., Nakayama, K.I., Khochbin, S., Solary, E., Garrido, C.: HSP27 favors ubiquitination and proteasomal degradation of p27^{Kip1} and helps S-phase re-entry in stressed cells. *FASEB J.*, 20: 1179-1181 (2006).
- Fotovati, A., Nakayama, K., Nakayama, K.I.: Impaired germ cell development due to compromised cell cycle progression in Skp2-deficient mice. *Cell Div.*, 1: 4 (2006).
- Niki, S., Oshikawa, K., Mouri, Y., Hirota, F., Matsushima, A., Yano, M., Han, H., Bando, Y., Izumi, K., Matsumoto, M., Nakayama, K.I., Kuroda, N., Matsumoto, M.: Alteration of intra-pancreatic target-organ specificity by abrogation of Aire in NOD mice. *J. Clin. Invest.*, 116: 1292-1301 (2006).
- Shukla, A., Barrett, T.F., Nakayama, K.I., Nakayama, K., Mossman, B.T., Lounsbury, K.M.: Transcriptional up-regulation of MMP12 and MMP13 by asbestos occurs via a PKC δ -dependent pathway in murine lung. *FASEB J.*, 20: 997-999 (2006).
- Nojima, T., Hayashi, K., Goitsuka, R., Nakayama, K., Nakayama, K.I., Kitamura, D.: Double knockout mice show BASH and PKCdelta have different epistatic relationships in B cell

- maturation and CD40-mediated activation. *Immunol. Lett.*, 105: 48-54 (2006).
- Shimazu, T., Komatsu, Y., Nakayama, K.I., Fukazawa, H., Horinouchi, S., Yoshida, M.: Regulation of SV40 large T-antigen stability by reversible acetylation. *Oncogene*, 25: 7391-7400 (2006).
 - Tsukuba, T., Yamamoto, S., Yanagawa, M., Okamoto, K., Okamoto, Y., Nakayama, K.I., Kadowaki, T., Yamamoto, K.: Cathepsin E-deficient mice show increased susceptibility to bacterial infection associated with the decreased expression of multiple cell surface Toll-like receptors. *J. Biochem.*, 140: 57-66 (2006).
 - Tsunematsu, R., Nishiyama, M., Kotoshiba, S., Saiga, T., Kamura, T., Nakayama, K.I.: Fbxw8 is essential for Cul1-Cul7 complex formation and for placental development. *Mol. Cell. Biol.*, 26: 6157-6169 (2006).
 - Fujii, Y., Yada, M., Nishiyama, M., Kamura, T., Takahashi, H., Tsunematsu, R., Susaki, E., Nakagawa, T., Matsumoto, A., Nakayama, K.I.: Fbxw7 contributes to tumor suppression by targeting multiple proteins for ubiquitin-dependent degradation. *Cancer Sci.*, 97: 729-736 (2006).
 - Kanematsu, T., Yasunaga, A., Mizoguchi, Y., Kuratani, A., Kittler, J.T., Jovanovic, J.N., Takenaka, K., Nakayama, K.I., Fukami, K., Takenawa, T., Moss, S.J., Nabekura, J., Hirata, M.: Modulation of GABA_A receptor phosphorylation and membrane trafficking by phospholipase C-related inactive protein/protein phosphatase 1 and 2A signaling complex underlying brain-derived neurotrophic factor-dependent regulation of GABAergic inhibition. *J. Biol. Chem.*, 281: 22180-22189 (2006).
 - Hiramatsu, Y., Kitagawa, K., Suzuki, T., Uchida, C., Hattori, T., Kikuchi, H., Oda, T., Hatakeyama, S., Nakayama, K.I., Yamamoto, T., Konno, H., Kitagawa, M.: Degradation of Tob1 mediated by SCF^{Skp2}-dependent ubiquitination. *Cancer Res.*, 66: 8477-8483 (2006).
 - Matsumoto, A., Onoyama, I., Nakayama, K.I.: Expression of mouse Fbxw7 isoforms is regulated in a cell cycle- or p53-dependent manner. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 350: 114-119 (2006).
 - Shirane, M., Nakayama, K.I.: Protrudin induces neurite formation by directional membrane trafficking. *Science*, 314: 818-821 (2006).
 - Hara, K., Nakayama, K.I., Nakayama, K.: Geminin is essential for the development of preimplantation mouse embryos. *Genes Cells*, 11: 1281-1293 (2006).
 - Takahashi, A., Ohtani, N., Yamakoshi, K., Iida, S., Tahara, H., Nakayama, K., Nakayama, K.I., Ide, T., Saya, H., Hara, E.: Mitogenic signalling and the p16^{INK4a}-Rb pathway cooperate to enforce irreversible cellular senescence. *Nature Cell Biol.*, 8: 1291-1297 (2006).
 - Gao, Y., Kitagawa, K., Hiramatsu, Y., Kikuchi, H., Isobe, T., Shimada, M., Uchida, C., Hattori, T., Oda, T., Nakayama, K., Nakayama, K.I., Tanaka, T., Konno, H., Kitagawa, M.: Up-regulation of GPR48 induced by down-regulation of p27^{Kip1} enhances carcinoma cell invasiveness and

metastasis. *Cancer Res.*, 66: 11623-11631 (2006).

- Pula, G., Schuh, K., Nakayama, K., Nakayama, K.I., Walter, U., Poole, A.W.: PKC δ regulates collagen-induced platelet aggregation through inhibition of VASP-mediated filopodia formation. *Blood*, 108: 4035-4044 (2006).
- Shukla, A., Lounsbury, K.M., Barrett, T.F., Gell, J., Rincon, M., Butnor, K.J., Taatjes, D.J., Davis, G.S., Vacek, P., Nakayama, K.I., Nakayama, K., Steele, C., Mossman, B.T.: Asbestos-induced peribronchiolar cell proliferation and cytokine production are attenuated in lungs of protein kinase C- δ knockout mice. *Am. J. Pathol.*, 170: 140-151 (2007).
- Tu, X., Joeng, K.S., Nakayama, K.I., Nakayama, K., Rajagopal, J., Carroll, T.J., McMahon, A.P., Long, F.: Noncanonical Wnt signaling through G protein-linked PKC δ activation promotes bone formation. *Dev. Cell*, 12: 113-127 (2007).
- Yanagawa, M., Tsukuba, T., Nishioku, T., Okamoto, Y., Okamoto, K., Takii, R., Terada, Y., Nakayama, K.I., Kadowaki, T., Yamamoto, K.: Cathepsin E deficiency induces a novel form of lysosomal storage disorder showing the accumulation of lysosomal membrane sialoglycoproteins and the elevation of lysosomal pH in macrophages. *J. Biol. Chem.*, 282: 1851-1862 (2007).
- Itoh, Y., Masuyama, N., Nakayama, K., Nakayama, K.I., Gotoh, Y.: The cyclin-dependent kinase inhibitors p57 and p27 regulate neuronal migration in the developing mouse neocortex. *J. Biol. Chem.*, 282: 390-396 (2007).
- Sakai, T., Sakaue, H., Nakamura, T., Okada, M., Matsuki, Y., Watanabe, E., Hiramatsu, R., Nakayama, K., Nakayama, K.I., Kasuga, M.: Skp2 controls adipocyte proliferation during the development of obesity. *J. Biol. Chem.*, 282: 2038-2046 (2007).
- Uchida, T., Iwashita, N., Ohara-Imaizumi, M., Ogihara, T., Nagai, S., Choi, J.B., Tamura, Y., Tada, N., Kawamori, R., Nakayama, K.I., Nagamatsu, S., Watada, H.: Protein kinase C δ plays a non-redundant role in insulin secretion in pancreatic beta cells. *J. Biol. Chem.*, 282: 2707-2716 (2007).
- Mizokami, A., Kanematsu, T., Ishibashi, H., Yamaguchi, T., Tanida, I., Takenaka, K., Nakayama, K.I., Fukami, K., Takenawa, T., Kominami, E., Moss, S.J., Yamamoto, T., Nabekura, J., Hirata, M.: Phospholipase C-related inactive protein is involved in trafficking of γ 2 subunit-containing GABA_A receptors to the cell surface. *J. Neurosci.*, 27: 1692-1701 (2007).
- Matsuda, T., Matsumoto, A., Uchida, M., Kanaly, R., Misaki, K., Shibutani, S., Kawamoto, T., Kitagawa, K., Nakayama, K.I., Tomokuni, K., Ichiba, M.: Increased formation of hepatic N2-ethylidene-2'-deoxyguanosine DNA adducts in aldehyde dehydrogenase 2 knockout mice treated with ethanol. *Carcinogenesis*, in press (2007).
- Liu, Z., Liu, X., Nakayama, K.I., Nakayama, K., Ye, K.: Protein kinase C- δ phosphorylates Ebp1 and prevents its proteolytic degradation, enhancing cell survival. *J. Neurochem.*, 100: 1278-1288 (2007).

- Moller, C., Karlberg, M., Abrink, M., Nakayama, K.I., Motoyama, N., Nilsson, G.: Bcl-2 and Bcl-X_L are indispensable for the late phase of mast cell development from mouse embryonic stem cells. *Exp. Hematol.*, 35: 385-393 (2007).
- Nakagawa, T., Shirane, M., Iemura, S., Natsume, T., Nakayama, K.I.: Anchoring of the 26S proteasome to the organellar membrane by FKBP38. *Genes Cells*, 12: 709-712 (2007).
- Miyamoto, K., Araki, K.Y., Naka, K., Arai, F., Takubo, K., Yamazaki, S., Matsuoka, S., Miyamoto, T., Ito, K., Ohmura, M., Chen, C., Hosokawa, K., Nakauchi, H., Nakayama, K., Nakayama, K.I., Harada, M., Motoyama, N., Suda, T., Hirao, A. Foxo3a is essential for maintenance of the hematopoietic stem cell pool. *Cell Stem Cell*, [in press](#).
- Susaki, E., Nakayama, K., Nakayama, K. I.: Cyclin D2 translocates p27 out of the nucleus and promotes its degradation at the G0-G1 transition. *Mol. Cell. Biol.*, 27: 4626-4640 (2007).

(2) 特許出願

平成 18年度特許出願:0 件 (CREST 研究期間累積件数:5 件)